

09/622815

REC'D 08 APR 1999

WIPO PCT

PCT/JP 99/00772

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

22.02.99

JP99/772

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

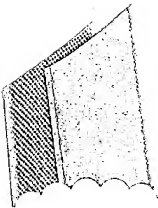
1998年 6月10日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第162118号

出願人
Applicant(s):

財団法人相模中央化学研究所
朝海 伶

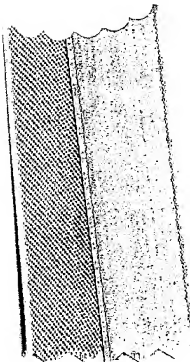
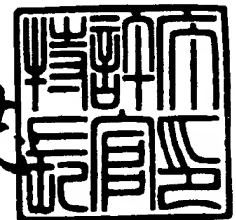


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 3月26日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3017503

【書類名】 特許願

【整理番号】 KJ0065

【提出日】 平成10年 6月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明の名称】 アポトーシス抑制剤

【請求項の数】 18

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県大宮市土手町1丁目279-1 北大宮住宅1号
棟403号

【氏名】 朝海 怜

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市上鶴間3734-6

【氏名】 袖岡 幹子

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市本荘3-8-20-804

【氏名】 藤田 美歌子

【特許出願人】

【代表出願人】

【識別番号】 000173762

【住所又は居所】 神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号

【氏名又は名称】 財団法人相模中央化学研究所

【代表者】 近藤 聖

【電話番号】 0427(42)4791

【特許出願人】

【識別番号】 598023997

【住所又は居所】 埼玉県大宮市土手町1丁目279-1 北大宮住宅1号
棟403号

【氏名又は名称】 朝海 怜

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第 40147号

【出願日】 平成10年 2月23日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011501

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

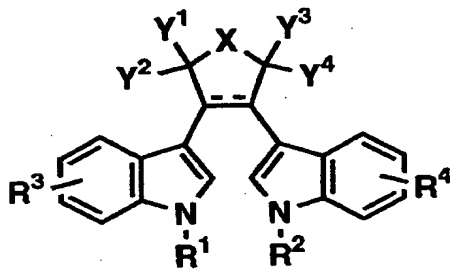
【書類名】 明細書

【発明の名称】 アポトーシス抑制剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記一般式 [I]

【化 1】



(式中、Xは酸素原子、または置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアリール基、ヒドロキシル基、置換基を有していてもよいアルコキシル基、置換基を有していてもよいアリールオキシ基、置換基を有していてもよいアミノ基もしくは水素原子のいずれか1個を伴う窒素原子を表し、 Y^1 と Y^2 及び Y^3 と Y^4 はそれぞれ独立に、2個の水素原子あるいは水素原子とヒドロキシル基を表すか、または一体となってカルボニル基を表し、 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、または置換基を有していてもよいアリール基、置換基を有していてもよいアシル基、置換基を有していてもよいアルコキシもしくはアリールオキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールチオカルボニル基、置換基を有していてもよいアミノカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールスルホニル基、置換基を有していてもよいアルコキシル基、置換基を有していてもよいアリールオキシ基、またはヒドロキシル基を表し、 R^3 、 R^4 はそれぞれインドール環上の置換基を表し、置換基の数及び置換位置（インドール環の位置番号で2,4,5,6あるいは7位）ならびに置換基の種類はそれぞれ同じでも異なってもよく、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、置換基を有していても

よいアリール基、置換基を有していてもよいアシル基、置換基を有していてもよいアルコキシもしくはアリールオキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールチオカルボニル基、置換基を有していてもよいアミノカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルまたはアリールスルホニル基、置換基を有していてもよいアルコキシ基、置換基を有していてもよいアリールオキシ基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールチオ基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、シアノ基、ニトロ基、置換基を有していてもよいアミノ基、またはハロゲン原子を表し、また、 R^1 と R^2 、 R^1 と R^3 または R^2 と R^4 は一体となって置換基を有していてもよい炭化水素鎖を形成していてもよい。式中破線をともなう結合は二重結合または単結合を表す)で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とするアポトーシス抑制剤。

【請求項2】 上記一般式[I]で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする、アルツハイマー病、脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy, SMA)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病、ハンチントン病、網膜色素変性症や緑内障、小脳変性などの神経変性疾患に対する、神経細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

【請求項3】 上記一般式[I]で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする新生児核黄疸に対する、神経細胞死を抑制することによる予防または治療薬。

【請求項4】 上記一般式[I]で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする、筋ジストロフィーに対する細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

【請求項5】 上記一般式[I]で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする、脳卒中等による脳虚血およびその後の遅発性神経細胞死 (DND) に対する、神経細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

【請求項6】 上記一般式[I]で表されるビスインドリルマレイミド誘導体また

はその医薬として許容されうる塩を有効成分とする心筋梗塞等による虚血性心疾患、ウイルス性心筋炎、自己免疫性心筋炎、肥大心および不全心にみられる心筋障害／細胞死、不整脈源性右室心筋症に対する、心筋細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

【請求項 7】 上記一般式 [I] で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とするアルコール性肝炎もしくはウイルス性肝炎に対する、肝細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

【請求項 8】 上記一般式 [I] で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする糸球体腎炎や溶血性尿毒症症候群等の腎疾患に対する、腎細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

【請求項 9】 上記一般式 [I] で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする後天性免疫不全症候群（AIDS）に対する、過剰な T 細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

【請求項 10】 上記一般式 [I] で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする中毒性表皮壊死融解（toxic epidermal necrolysis, TEN）、多形滲出性紅斑などの炎症性皮膚疾患や脱毛症ならびに移植片宿主反応（GVH）に対する、細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

【請求項 11】 上記一般式 [I] で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする放射線照射に伴う障害もしくは抗癌剤による副作用に対する、細胞死を抑制することによる障害や副作用の予防もしくは治療薬。

【請求項 12】 上記一般式 [I] で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする敗血症に対する、細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

【請求項 13】 上記一般式 [I] で表されるビスインドリルマレイミド誘導体ま

たはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする再生不良性貧血などの骨髄異形成症に対する、骨髄由来細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

【請求項 14】 上記一般式 [I] で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とするインスリン依存性糖尿病に対する、細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

【請求項 15】 上記一般式 [I] で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とするプリオン病に対する、神経細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

【請求項 16】 上記一般式 [I] で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分として含有する、臓器、組織または細胞移植時の移植臓器、組織または細胞の機能不全の予防または治療薬。

【請求項 17】 上記一般式 [I] で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分として含有する、臓器、組織および細胞の保存剤。

【請求項 18】 初代培養細胞に、試験化合物の存在下にアポトーシス誘導刺激を加えるか、もしくはアポトーシス誘導刺激を加えた直後に試験化合物を加え、細胞の死滅割合を評価することを特徴とする細胞死抑制物質のアッセイ法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、各種生体物質もしくは外来物質刺激、あるいは温度、放射線等の刺激によっておこる細胞死を抑制しうるアポトーシス抑制剤、およびその神経変性疾患、循環器系疾患、肝炎、腎疾患、炎症性皮膚疾患、放射線障害、ウイルス性疾患、プリオン病、または臓器等の移植時の機能不全等の治療もしくは症状の進行の予防の為の医薬としての用途、生体から取り出した臓器、組織、並びに細胞の保存剤としての用途、ならびに細胞死抑制物質を探索するためのアッセイ法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年のアポトーシスに関する研究の進展により、様々な病気の進行、増悪に、生体にとって必須な細胞の細胞死、特にアポトーシスが行っていることが明らかとなってきた (Science, 267巻, 1456頁, 1995年)。アポトーシスとは、細胞が自らに備わる機構を用いて実行する細胞死であり、その一般的特徴としては (1) クロマチン凝集、(2) 細胞縮小、(3) 細胞膜のブレッピング (突起形成)、(4) 核の断片化、(5) アポトーシス小体の形成、(6) DNAの断片化、(7) 近隣の細胞やマクロファージによる貪食などが挙げられる。しかし細胞の種類や置かれた環境、細胞死誘発刺激の種類や強度により必ずしも上記の特徴の全てを示さない場合もある。従って本発明においては、過度の放射線、熱、あるいは刺激物質等により細胞が自らに備わる自死プログラムを実行する間も無く細胞の膨化および融解を起こし崩壊する細胞死 (ネクローシス) 以外の細胞死をすべてアポトーシスとして定義する (病理学的にネクローシスと呼ばれているものには、なんらかの細胞内機構が働いた結果おこる細胞死も含まれており、本発明ではこのような細胞死もアポトーシスに含めるものとする)。

【0003】

アポトーシスによる細胞死がその進行増悪の原因となっている疾患としては、例えば、アルツハイマー病 (Bio Science 用語ライブラリー: アポトーシス/実験医学別冊, 168頁, 1996年)、脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular artophy, SMA) (Bio Science 用語ライブラリー: アポトーシス/実験医学別冊, 173頁, 1996年)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) (Bio Science 用語ライブラリー: アポトーシス/実験医学別冊, 176頁, 1996年)、パーキンソン病 (J. Neurochem., 69巻, 1612頁, 1997年)、ハンチントン病 (J. Neurosci., 15巻, 3775頁, 1995年)、網膜色素変性症や緑内障 (Bio Science 用語ライブラリー: アポトーシス/実験医学別冊, 196頁, 1996年)、小脳変性、新生児核黄疸などの神経変性疾患 (Progress in Drug Research, 48巻, 55頁, 1997年)、筋ジストロフィー (J. Clinical Investigation, 99巻, 2745頁, 1997年)、脳卒中等による脳虚血およびその後の遅発性神経細胞死 (DND) (Bio Science 用語ライブラリー: アポトーシス/実験医学別冊, 180, 182頁, 1996年)、心筋梗塞等による虚血性心疾患

(心筋虚血と再灌流障害)、ウイルス性心筋炎、自己免疫性心筋炎(拡張型心筋症や慢性心筋炎等)、肥大心および不全心にみられる心筋障害/細胞死、不整脈源性右室心筋症(Bio Science 用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 198頁, 1996年、血管と内皮, 7巻, 357, 364, 370頁, 1997年)、アルコール性肝炎やウイルス性肝炎(Bio Science 用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 190頁, 1996年)、糸球体腎炎や溶血性尿毒症症候群等の腎疾患(Bio Science 用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 192頁, 1996年)、後天性免疫不全症候群(AIDS)(Bio Science 用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 156頁, 1996年、血液・免疫・腫瘍, 2巻, 432頁, 1997年)、中毒性表皮壊死融解(TEN)、多形滲出性紅斑などの炎症性皮膚疾患や脱毛症ならびに移植片宿主反応(GVH)(Bio Science 用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 194頁, 1996年)、さらには放射線障害(Bio Science 用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 160頁, 1996年)や抗癌剤による副作用(Bio Science 用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 162頁, 1996年)、敗血症(Critical Care Medicine, 25巻, 1298頁, 1997年)、再生不良性貧血などの骨髓異形成症(Leukemia, 7巻, 144頁, 1993年)、インスリン依存性糖尿病(Diabetes, 44巻, 733頁, 1995年)、クロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病(J. Neural Transmission. Supplementum, 50巻, 191頁, 1997年)等があげられる。また、臓器移植においても、ドナーの心停止あるいは摘出により阻血状態におかれた臓器に移植後血液が再灌流する際におこる活性酸素や種々のケミカルメディエーターによる細胞のアポトーシスが移植臓器の機能不全の原因であることが示唆されている(例えば、移植, 27巻, 15頁, 1992年)。また、臓器、組織、細胞移植後の拒絶反応も宿主免疫細胞による攻撃により移植された細胞がアポトーシスを起こした結果ととらえることができる。従ってアポトーシスを抑制する化合物はこれらの疾病等の有効な治療または症状の進行、悪化を停止もしくは抑制する医薬となりうると考えられる。

【0004】

臓器あるいは組織の移植においては、ドナーから摘出した臓器あるいは組織の保存状態が移植後の生着率の鍵を握る。従ってアポトーシスを抑制する化合物を

これら臓器または組織保存液に添加することにより細胞死を防ぎ、組織や臓器の保存性が向上すると期待される。また、生体から取り出してきた初代培養細胞は、癌細胞あるいは不死化した株化細胞と異なりその培養が比較的困難なことが多い。これは長期培養のためにはそれぞれの細胞の種類に応じて培地に様々な成長因子などを適切な濃度で添加培養する必要がある、培養条件によっては容易にアポトーシスを起こしてしまうためである。従って研究あるいは医療目的で細胞を培養する場合に、アポトーシスを抑制する化合物を培養液に添加することにより細胞の死を防ぎ、効率のよい培養を可能にすると期待される。

【0005】

アポトーシスは、細胞の種類により様々な生理的な物質、例えばインターロイキンなどのサイトカインやグルコルチコイドなどのホルモン、グルタミン酸やNMDAなどの神経興奮性アミノ酸やFasリガンドに代表されるような膜蛋白質などで引き起こされることが知られており、また逆に細胞によっては特定の成長因子などの欠損によっても引き起こされる。さらに種々の細胞に共通のアポトーシス誘発剤としては、過酸化水素などの活性酸素種発生剤、SNPなどのNO発生剤、熱、放射線などがあげられ、他にもアポトーシスの誘導活性をもつ化合物が数多く報告されている。最近の研究によると、その上流では多彩な情報伝達系がからむアポトーシスシグナルの伝達系も下流では一連のシステインプロテアーゼであるカスパーゼ活性化機構に収斂するらしいことが明らかになってきた (Cell, 91巻, 443頁, 1997年)。

【0006】

アポトーシス抑制剤として現在までに知られているものとしては、細胞の種類に応じて各種成長因子や栄養因子、ホルモン等の生理的な抑制剤、N-アセチルシステインなどの抗酸化剤、カスパーゼ類の修飾ペプチド型の阻害剤などが知られている。この中で、一部のペプチド性の成長因子や神経栄養因子などが化学療法後の造血細胞回復や神経変性疾患や外傷による神経細胞死を防ぐ治療に用いられている例はあるものの (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90巻, 7951頁, 1993年, Nature, 367巻, 368頁, 1994年, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89巻, 11249頁, 1992年)、抗酸化剤やカスパーゼ類の阻害剤は細胞レベルの実験に用いら

れるにとどまっております、より生体内での安定性がより高く、経口投与可能な非ペプチド型低分子アポトーシス阻害剤の開発が望まれていた。また、実際の疾病で個々の細胞にアポトーシスを引き起こす生理的誘導因子や抑制因子などがすべて明らかになっている例は少なく、それらが未解明の疾病にも有効と考えられるシグナル伝達系のより下流に作用する全く新しいタイプのアポトーシス抑制剤が求められていた。

【0007】

現在臓器保存液としては一般にEuro-Collins液やUW液などが用いられており（移植，27巻，172頁，1992年）、さらに上記の活性酸素障害を防ぐ目的で種々の抗酸化剤やラジカルスカベンジャーの添加が試みられ保存成績の向上が報告されている（例えば、移植，27巻，15頁，1992年、26巻，62頁，1991年、25巻，596頁，1990年、Trans Proc，17巻，1454頁，1985年）。しかしその保存成績は必ずしも十分ではなく、より高い生着率が求められていた。

【0008】

アポトーシス抑制剤のアッセイ法としては、現在培養の容易な癌細胞や不死化した株化細胞を用いて広範なスクリーニングが行われているが、これらの細胞はなんらかの形でそのアポトーシスの仕組みに異常をきたして不死化している場合がほとんどであり、正常細胞のアポトーシスを抑制する化合物が効果を示さない恐れがあり、よりよい簡便なアッセイ法が求められていた。

【0009】

一方、ビスインドリルマレイミド誘導体は、プロテインキナーゼ、特にプロテインキナーゼC阻害活性があることが報告されており（例えば特開平2-306974、DE 3835842）、抗癌剤等としての用途は公知であるが、これらの誘導体のアポトーシス抑制作用を示すことについては一切報告がない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、アポトーシスによる細胞死がその進行増悪に関っている種々の疾患の症状の進行の予防および治療薬として期待される、アポトーシスを抑制する有用な薬剤を提供することにある。

【0011】

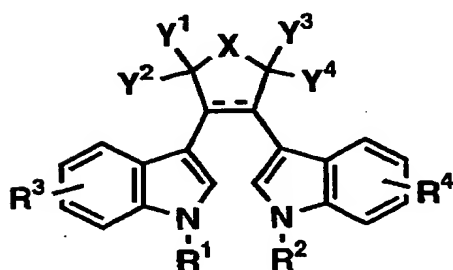
【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意検討した結果、下記のビスインドリルマレイミド誘導体がアポトーシス抑制作用を有することを見だし、本発明を完成させた。

すなわち本発明は、下記一般式 [I]

【0012】

【化2】



【0013】

(式中、Xは酸素原子、または置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアリール基、ヒドロキシル基もしくは水素原子のいずれか1個を伴う窒素原子を表し、Y¹とY²及びY³とY⁴はそれぞれ独立に、2個の水素原子あるいは水素原子とヒドロキシル基を表すか、または一体となってカルボニル基を表し、R¹、R²はそれぞれ独立に水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、または置換基を有していてもよいアリール基、置換基を有していてもよいアシル基、置換基を有していてもよいアルコキシもしくはアリールオキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールチオカルボニル基、置換基を有していてもよいアミノカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールスルホニル基、置換基を有していてもよいアルコキシル基、置換基を有していてもよいアリールオキシ基、またはヒドロキシル基を表し、R³、R⁴はそれぞれインドール環上の置換基を表し、置換基の数及び置換位置（インドール環の位置番号で2,4,5,6あるいは7位）ならびに置換基の種類はそれぞれ同じでも異なってもよく、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル

基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、置換基を有していてもよいアリール基、置換基を有していてもよいアシル基、置換基を有していてもよいアルコキシもしくはアリールオキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールチオカルボニル基、置換基を有していてもよいアミノカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルまたはアリールスルホニル基、置換基を有していてもよいアルコキシル基、置換基を有していてもよいアリールオキシ基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールチオ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、シアノ基、ニトロ基、置換基を有していてもよいアミノ基、またはハロゲン原子を表し、また、 R^1 と R^2 、 R^1 と R^3 または R^2 と R^4 は一体となって置換基を有していてもよい炭化水素鎖を形成していてもよい。式中破線をともなう結合は二重結合または単結合を表す)で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とするアポトーシス抑制剤、アルツハイマー病、脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy, SMA)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病、ハンチントン病、網膜色素変性症や緑内障、小脳変性などの神経変性疾患に対する、神経細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬、新生児核黄疸に対する、神経細胞死を抑制することによる予防または治療薬、筋ジストロフィーに対する細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬、脳卒中等による脳虚血およびその後の遅発性神経細胞死 (DND) に対する、神経細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬、心筋梗塞等による虚血性心疾患、ウイルス性心筋炎、自己免疫性心筋炎、肥大心および不全心にみられる心筋障害／細胞死、不整脈源性右室心筋症に対する、心筋細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬、アルコール性肝炎もしくはウイルス性肝炎に対する、肝細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬、糸球体腎炎や溶血性尿毒症症候群等の腎疾患に対する、腎細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬、後天性免疫不全症候群 (AIDS) に対する、過剰なT細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬、中毒性表皮壊死融解 (TEN)、多形滲出性紅斑などの炎症性皮膚疾患や脱毛症ならびに移植片宿主反応 (GVH) に対する、細胞死を抑制することによる症

状の進行の予防または治療薬、放射線照射に伴う障害もしくは抗癌剤による副作用に対する、細胞死を抑制することによる障害や副作用の予防もしくは治療薬、敗血症に対する、細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬、再生不良性貧血などの骨髓異形成症に対する、骨髓由来細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬、インスリン依存性糖尿病に対する、細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬、プリオン病に対する、神経細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬、臓器、組織または細胞移植時の移植臓器、組織または細胞の機能不全の予防または治療薬、臓器、組織および細胞の保存剤、ならびに初代培養細胞に、試験化合物の存在下にアポトーシス誘導刺激を加えるか、もしくはアポトーシス誘導刺激を加えた直後に試験化合物を加え、細胞の死滅割合を評価することを特徴とする細胞死抑制物質のアッセイ法を提供する。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明に係るビスインドリルマレイミド誘導体は、市販されているか (CALBIO CHEM社、LC Laboratory社等)、または公知の方法 (例えば Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年、J. Biol. Chem., 266巻, 15771頁, 1991年、J. Med. Chem., 35巻, 177頁, 994頁, 1992年、J. Med. Chem., 36巻, 21頁, 1993年) もしくは類似の方法により合成することができる。

【0015】

本明細書中、「置換基を有していてもよいアルキル基」におけるアルキル基とは、直鎖状、分岐状、環状いずれでもよく、例えば炭素数1～30のアルキル基、具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、14-メチルペンタデシル基、6-メチルペンタデシル基、オクタデシル基、イコシル基、テトラコシル基などがあげられる。

【0016】

本明細書中、「置換基を有していてもよいアルケニル基」におけるアルケニル基とは、直鎖状、分岐状、環状いずれでもよく、例えば炭素数2～30のアルケニル基、具体的にはアリル基、ビニル基、クロチル基、1-ペンテン-1-イル基、2-ペンテン-1-イル基、3-ペンテン-1-イル基、1-ヘキセン-1-イル基、2-ヘキセン-1-イル基、3-ヘキセン-1-イル基、2-シクロヘキセニル基、2-シクロペンテニル基、8-ヘプタデセン-1-イル基、8,11-ヘプタデカジエン-1-イル基、8,11,14-ヘプタデカトリエン-1-イル基、4,7,10,13-ノナデカテトラエン-1-イル基、9-オクタデセン-1-イル基、9,12-オクタデカジエン-1-イル基、9,12,15-オクタデカトリエン-1-イル基、6,9,12-オクタデカトリエン-1-イル基、5,8,11,14-イコサテトラエン-1-イル基、5,8,11,14,17-イコサペンタエン-1-イル基、4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン-1-イル基、などがあげられる。

【0017】

本明細書中、「置換基を有していてもよいアルキニル基」におけるアルキニル基とは、直鎖状、分岐状、環状いずれでもよく、例えば炭素数2～30のアルキニル基、具体的にはエチニル基、プロパルギル基、1-ペンチン-1-イル基、2-ペンチン-1-イル基、3-ペンチン-1-イル基、1-オクチン-1-イル基、8-ヘプタデシン-1-イル基などがあげられる。

【0018】

本明細書中、「置換基を有していてもよいアリール基」におけるアリール基とは、ヘテロアリール基をも包含し、例えばフェニル基、ナフチル基、アンスラニル基、ピレニル基、ビフェニル基、4-ピリジル基、2-ピリジル基、ピリミジニル基、ピラジニル基、ピリダニジル基、ピペラジニル基、ピラゾリル基、イミダゾリル基、キニリル基、ピロリル基、インドリル基、フリル基などがあげられる。

【0019】

本明細書中、「置換基を有していてもよいアシル基」におけるアシル基とは、直鎖状、分岐状、環状、飽和、不飽和の脂肪族、あるいは芳香族いずれでもよく

、例えば炭素数 2～30 のアシル基、具体的にはアセチル基、プロピオニル基、イソプロピオニル基、ピバロイル基、オレオイル基、シクロヘキシルカルボニル基、アクロイル基、クロトノイル基、ベンゾイル基、ナフトイル基、ニコチノイル基などがあげられる。

【0020】

本明細書中、「置換基を有していてもよいアルコキシもしくはアリアルオキシカルボニル基」におけるアルコキシもしくはアリアルオキシカルボニル基は、直鎖状、分岐状、環状、飽和、不飽和の脂肪族、あるいは芳香族いずれでも良く、例えばメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロピルオキシカルボニル基、イソプロピルオキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基、s-ブトキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基、シクロペンチルオキシカルボニル基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、アリルオキシカルボニル基、フェニルオキシカルボニル基、ピリジルオキシカルボニル基などの基があげられる。

【0021】

本明細書中、「置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリアルチオカルボニル基」におけるアルキルもしくはアリアルチオカルボニル基は、直鎖状、分岐状、環状、飽和、不飽和の脂肪族、あるいは芳香族いずれでも良く、例えばメチルチオカルボニル基、エチルチオカルボニル基、プロピルチオカルボニル基、イソプロピルチオカルボニル基、ブチルチオカルボニル基、t-ブチルチオカルボニル基、シクロペンチルオキシチオカルボニル基、シクロヘキシルオキシチオカルボニル基、ベンジルチオカルボニル基、フェニルチオカルボニル基、ピリジルチオカルボニル基などの基があげられる。

【0022】

本明細書中、「置換基を有していてもよいアミノカルボニル基」は、無置換カルバモイル基、あるいは置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよい芳香族基、水酸基、置換基を有していてもよいアルコキシ基、置換基を有していてもよいアミノ基などで置換されたカルバモイル基を示し、例えばカルバモイル基、エチルアミノカルボニル基、プロピルアミノカルボニル基、イ

ソプロピルアミノカルボニル基、ブチルアミノカルボニル基、*t*-ブチルアミノカルボニル基、シクロペンチルアミノカルボニル基、シクロヘキシルアミノカルボニル基、ベンジルアミノカルボニル基、フェニルアミノカルボニル基、ピリジルアミノカルボニル基、ベンジルオキシアミノカルボニル基などの基があげられる。

【0023】

本明細書中、「置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリアルスルホニル基」におけるアルキルもしくはアリアルスルホニル基は、直鎖状、分岐状、環状、飽和、不飽和の脂肪族、あるいは芳香族いずれでも良く、例えばメタンスルホニル基、エタンスルホニル基、ベンゼンスルホニル基、シクロヘキサンスルホニル基、ナフタレンスルホニル基などの基があげられる。

【0024】

本明細書中、「置換基を有していてもよいアルコキシル基もしくはアリアルオキシ基」における、アルコキシル基もしくはアリアルオキシ基は、直鎖状、分岐状、環状、飽和、不飽和の脂肪族、あるいは芳香族いずれでもよく、例えば炭素数2～30のアルコキシル基もしくはアリアルオキシ基、具体的にはメトキシ基、エトキシ基、プロピルオキシ基、*t*-ブトキシ基、アリルオキシ基、シクロペンチルオキシ基、シクロヘキシルオキシ基、ベンジルオキシ基、フェノキシ基などがあげられる。

【0025】

本明細書中、「置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリアルチオ基」における、アルキルもしくはアリアルチオ基は、直鎖状、分岐状、環状、飽和、不飽和の脂肪族、あるいは芳香族いずれでもよく、例えば炭素数2～30のアルキルもしくはアリアルチオ基、具体的にはメチルチオ基、エチルチオ基、プロピルチオ基、*t*-ブチルチオ基、アリルチオ基、シクロペンチルチオ基、シクロヘキシルチオ基、ベンジルチオ基、フェニルチオ基などがあげられる。

【0026】

本明細書中、「置換基を有していてもよいアミノ基」は、無置換アミノ基、あるいはアルキル基、芳香族基などで置換されたアミノ基を示し、例えばエチル

アミノ基、プロピルアミノ基、イソプロピルアミノ基、ブチルアミノ基、*t*-ブチルアミノ基、ベンジルアミノ基、フェニルアミノ基、ピリジルアミノ基、ピペラジニル基、インドリニル基などの基があげられる。

【0027】

本明細書中、「ハロゲン原子」はフッ素原子、塩素原子、臭素原子およびヨウ素原子があげられる。

【0028】

上記アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アシル基、アルコキシもしくはアリールオキシカルボニル基、アルキルチオもしくはアリールチオカルボニル基、アミノカルボニル基、アルコキシル基もしくはアリールオキシ基、アルキルもしくはアリールチオ基、アミノ基等が有していてもよい置換基としては、例えばアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アシル基、アルコキシもしくはアリールオキシカルボニル基、アルキルチオもしくはアリールチオカルボニル基、アミノカルボニル基、アルコキシル基もしくはアリールオキシ基、アルキルもしくはアリールチオ基をあげることができ、これらの具体例は前記と同様である。その他の置換基としては、アミノ基、ハロゲン基、ニトロ基、アミノ基（アシル基、アルコキシもしくはアリールオキシカルボニル基、カルバモイル基、置換スルホニル基、アルキル基、シクロアルキル基、アリール基等を置換基として有していてもよい）、シアノ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基などの基の他、ベンジル基、フェネチル基、ナフチルメチル基等のアラルキル基があげられる。

【0029】

医薬として許容されうる塩としては、酸部位を有する化合物については無機塩基または有機塩基との塩、例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、トリエチルアミン塩、エタノールアミン塩、リジン塩、アルギニン塩、キノリン塩、ピリジン塩等の脂肪族または複素環芳香族アミン塩、テトラメチルアンモニウム塩等の四級アンモニウム塩など、あるいは塩基部位を有する化合物については、無機酸または有機酸との塩、例えば塩酸塩、臭素酸塩、ヨウ素酸塩、硫酸塩、

硝酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸、乳酸塩、サリチル酸塩、マロン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、シュウ酸、アスコルビン酸塩等が挙げられる。

【0030】

本発明に係る化合物を医薬として使用する際の投与形態としては各種の形態を選択でき、例えば錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤もしくは液剤等の経口剤、注射剤、直腸投与剤、皮膚外用剤、吸入剤などの非経口投与剤等が挙げられる。

【0031】

固体の製剤は、そのまま錠剤、カプセル剤、顆粒剤または粉末の形態として製造することもできるが、適当な添加物を使用して製造することもできる。そのような添加物としては、例えば乳糖もしくはブドウ糖等の糖類、澱粉類、例えばステアリン酸等の脂肪酸、例えばメタケイ酸アルミン酸マグネシウムもしくは無水リン酸カルシウム等の無機塩、例えばポリビニルピロリドンもしくはポリアルキレングリコールなどの合成高分子、例えばステアリン酸カルシウムもしくはステアリン酸マグネシウム等の脂肪酸塩、例えばステアリルアルコールもしくはベンジルアルコール等のアルコール類、例えばメチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースもしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース等の合成セルロース誘導体、その他、水、ゼラチン、タルク、植物油、アラビアゴム等通常用いられる添加物が挙げられる。

【0032】

液状製剤は、水、アルコール類または例えば大豆油、ピーナッツ油もしくはゴマ油等の植物由来の油等液状製剤において通常用いられる適当な添加物を使用し、懸濁液、シロップ剤もしくは注射剤等の形態として製造される。

【0033】

特に、注射剤として投与する場合の適当な溶剤としては、例えば注射用蒸留水、塩酸リドカイン水溶液、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、エタノール、静脈内注射用液体（例えばクエン酸及びクエン酸ナトリウム等の水溶液）、電解質溶液等、またはこれらの混合溶液が挙げられる。これらの注射剤は予め溶解したものの他、粉末のまま或いは適当な添加物を加えたものを用时溶解する形態もとりうる。

【0034】

直腸投与剤を製造するには、活性成分及びカカオ脂、脂肪酸のトリ、ジオよびモノグリセリド、ポリエチレングリコールなどの坐剤用基剤とを加温して熔融し型に流し込んで冷却するか、活性成分をポリエチレングリコール、大豆油などに溶解した後ゼラチン膜で被覆すればよい。

【0035】

皮膚外用剤を製造するには、活性成分をワセリン、ミツロウ、流動パラフィン、ポリエチレングリコールなどに加えて、必要ならば加温して練合し軟膏剤とするか、ロジン、アクリル酸アルキルエステル重合体などの粘着剤と練合した後、ポリエチレンなどの不織布に展延してテープ剤とする。

【0036】

吸入剤を製造するには、活性成分をフロンガスなどの噴射剤に溶解または分散して耐圧容器に充填しエアロゾール剤とする。

【0037】

本発明の化合物の実際に好ましい投与量は、配合された組成物の種類、適用頻度及び治療すべき疾病、さらに患者の年齢、体重、病態によって異なるが、通常1日約1~1000mg、好ましくは5~500mgであり、1回ないし数回にわけて投与することが望ましい。

【0038】

本発明に係る臓器としてはあらゆる臓器が含まれ、例えば心臓、肺、肝臓、腎臓、すい臓、腸などがあげられる。

【0039】

本発明に係る組織としてはあらゆる組織が含まれ、例えば皮膚、角膜、骨髄、血管、骨などがあげられる。

【0040】

本発明において、移植による細胞の機能維持もしくはその保存への効果が期待される細胞としてはすべての細胞（正常な各種細胞、不死化した株化細胞、癌化した細胞や、治療あるいは研究目的で遺伝子工学的に修飾した細胞など）が含ま

れ、例えば血球系細胞、脾ランゲルハンス島細胞、上皮系細胞、神経系細胞などがあげられる。

【0041】

また、本発明に係る化合物を臓器、組織、または細胞の保存剤として使用する際の投与形態としては各種の形態を選択でき、例えば適当な塩類や栄養素などを含む培養液や保存液に本化合物もしくはその医薬として許容されうる塩を添加することができるほか、臓器移植の場合は臓器摘出前のドナーに体内灌流、静脈内投与などで投与することもできる。

【0042】

本発明のアッセイ法で使用する初代培養細胞としては、動物より単離し培養しうるあらゆる細胞が含まれ、例えば神経細胞、肝細胞、腎細胞、皮膚細胞、心筋細胞、血管細胞、白血球や赤血球などの血球系細胞、卵巣細胞などがあげられ、特に種々のアポトーシス刺激に反応して高度に同調的な細胞死が光学顕微鏡で容易に観察されることなどから、卵巣顆粒膜細胞が好ましい。

【0043】

本発明のアッセイ法で使用するアポトーシス誘導刺激としては、初代培養細胞にアポトーシスを誘導しうるあらゆる刺激が含まれ、例えば血清や各種成長因子やホルモンの欠損、グルココルチコイドなどのホルモン類、プロスタグランジンなどの局所ケミカルメディエーター類、TNFなどのサイトカイン類、グルタミン酸、ビリルビンのような生理的物質、あるいはFas抗体、過酸化水素などの活性酸素種発生試薬、SNPなどのNO発生試薬、エトポシドなどの抗がん剤、スタウロスポリン（例えば J. Cell Biol. 133巻, 1053頁, 1996年）その他の各種細胞毒性薬剤等の添加、さらに放射線、熱などの物理的刺激などがあげられる。

【0044】

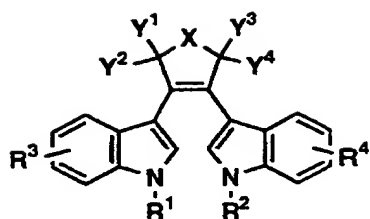
以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではないことはいうまでもない。

【0045】

【実施例】

【0046】

【化 3】

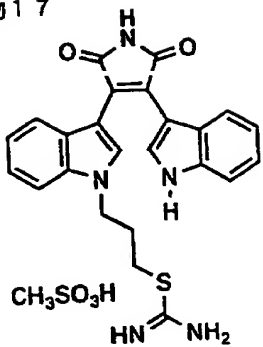


- 化合物 1 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = O,$
 $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 化合物 2 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NOH,$
 $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 化合物 3 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NH,$
 $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 化合物 4 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NCH_3,$
 $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 化合物 5 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NCH_2CH_2CH_3,$
 $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 化合物 6 : $Y^1, Y^2 = O, Y^3, Y^4 = OH, H, X = NCH_3,$
 $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 化合物 7 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NH,$
 $R^1 = (CH_2)_3NH_2, R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 化合物 8 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NH,$
 $R^1 = (CH_2)_3N(CH_3)_2, R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 化合物 9 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NCH_3,$
 $R^1 = (CH_2)_3NH_2, R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 化合物 10 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NCH_3,$
 $R^1 = (CH_2)_3NHCOCH_3, R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 化合物 11 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NCH_3,$
 $R^1 = (CH_2)_3NHCOPh, R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 化合物 12 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NCH_3,$
 $R^1 = COO^tBu, R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 化合物 13 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NCH_3,$
 $R^1 = R^2 = COO^tBu, R^3 = R^4 = H$
- 化合物 14 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NCH_3,$
 $R^1 = R^2 = R^3 = H, R^4 = 5-Cl$
- 化合物 15 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NCH_3,$
 $R^1 = R^2 = H, R^3 = R^4 = 7-CH_3$
- 化合物 16 : $Y^1, Y^2 = Y^3, Y^4 = O, X = NH,$
 $R^1 = (CH_2)_3NH_2, R^2 = CH_3, R^3 = R^4 = H$

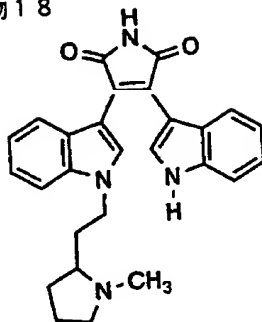
【0047】

【化4】

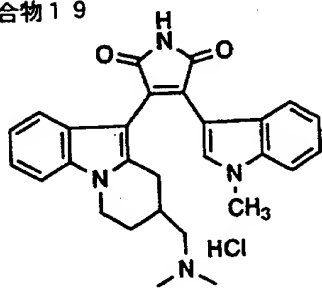
化合物 17



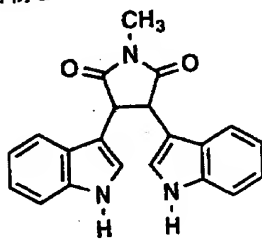
化合物 18



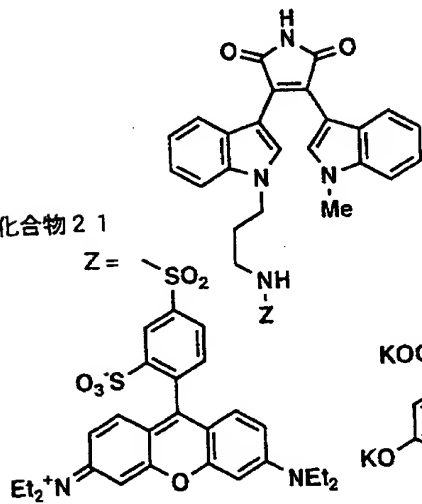
化合物 19



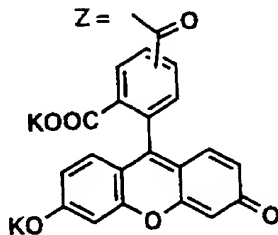
化合物 20



化合物 2 1



化合物 2 2



【 0 0 4 8 】

試驗例 1

【0049】

卵巣顆粒膜細胞は卵胞中で卵細胞をとり囲む細胞で、性周期にあわせて卵胞刺激ホルモン（FSH）並びに黄体化ホルモン（LH）により増殖分化し、プロゲステ

ロンの生産分泌能を獲得する。排卵しない卵胞は最終的にアポトーシスをおこして消滅する。この分化のプロセスは公知の方法 (Endocrinology, 136巻, 3470頁, 1995年) に従い、以下の *in vitro* の実験によって再現することが出来る。さらに以下に記すように最終分化能を維持したまま培養を続けるとアポトーシスをおこす。すなわちブタ卵巢をPBSバッファーで洗浄し、シリンジを用いて卵胞からブタ卵巢顆粒膜細胞 (Porcine Ovarian Granulosa Cells, POGC) を吸引採取する。この懸濁液を遠心分離して細胞分画を沈殿として回収し、さらにこの細胞分画をPBSに再懸濁し再び遠心分離する操作を3回くりかえし細胞を洗浄する。沈殿として得られたPOGCを培地 (10%仔牛血清を含むDMEM) で再懸濁し、さらにピペッティング操作で細胞塊を崩す。この細胞懸濁液をメッシュを通して混入した組織片等を取り除き、24穴細胞培養用ディッシュにまく。定法に従い (37℃, 5% CO₂) 2日間CO₂インキュベーターで培養したのち、浮遊細胞を除く為に培地を交換し、細胞がサブコンフルエント (0.7~2 × 10⁵ 細胞/well) になるまでさらに2-3日培養する。付着細胞を血清を含まない培地で洗浄後、血清を含まないFSHとLHを添加した培地 (5 μg/mL トランスフェリン, 40 ng/mL ハイドロコルチゾン, 4 mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA), 100 nM アンドロステンジオン および100 ng/mL FSH, 10 ng/mL LH を含む) でさらに3日間培養し、さらに培地 (上記と同じ組成) を替えて培養を続けると形態は線維芽細胞様から上皮細胞様に変化し、ホルモン産生能も活発化して完全に分化状態に移行する。この分化した細胞はさらに培養を続けると、約5日後に同調的に死滅することがトリパンプルーの排除テストならびにMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 試験によって示された。また、この細胞死がアポトーシスに特徴的な形態変化を示すことが光学顕微鏡並びに電子顕微鏡により観察された。本培養系の培地中に、最終的な培地交換後4日目の時点で3 μM の濃度で試験化合物8を加えたところ、試験化合物を加えた後7日後の観察でも95%以上の細胞が生存していた。

【0050】

試験例2

【0051】

試験例 1 に述べた方法で完全に分化させた細胞に、最終培地交換後 2 日でプロスタグランジン $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) ($50 \mu g/mL$) を加えると、16 時間後の観察で細胞はアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡により観察された。この培地に $PGF_2\alpha$ 添加前に試験化合物 8 ($3 \mu M$) を加え、同条件で培養を続けると細胞死が抑制され、16 時間後の観察で 95 %以上の細胞が生存していた。

【0052】

試験例 3

【0053】

試験例 1 と同様な方法で単離培養しサブコンフルエントに達した POGC を、無血清培地で洗浄後、血清および FSH と LH を含まない培地 ($5 \mu g/mL$ トランスフェリン, $40 ng/mL$ ハイドロコルチゾン, $4 mg/mL$ BSA, $100 nM$ アンドロステンジオンを含む) で培養する (ホルモン刺激を行わない) と、細胞は FSH と LH を加えた細胞 (試験例 1) に比べると比較的未分化のまま培養を続けることができるが、この無血清培地では長期間 (2~3 週間) 培養すると、やはりアポトーシスに特徴的な形態変化を示し死滅する事が光学顕微鏡により観察された。この細胞死は非同調的に少しずつおこり、約 1 週間かかってすべての細胞が死滅した。しかし本培養系の培地中に、試験化合物 8 ($3 \mu M$) を加えたところ細胞死が抑制され、試験化合物を加えない細胞が死滅して 7 日後の観察でも 95 %以上の細胞が生存していた。

【0054】

試験例 4

【0055】

試験例 1 と同様な方法で単離培養しサブコンフルエントに達した POGC を、無血清培地で洗浄後、試験例 1 と同様に血清および FSH と LH を含む培地 ($5 \mu g/mL$ トランスフェリン, $40 ng/mL$ ハイドロコルチゾン, $4 mg/mL$ BSA, $100 nM$ アンドロステンジオン および $100 ng/mL$ FSH, $10 ng/mL$ LH を含む) で培養を続けた完全に分化した細胞にスタウロスポリン ($3 nM$) を加えると、44 時間後の観察ではすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光

学顕微鏡により観察された。この培地にスタウロスポリン添加前に試験化合物 8 ($3 \mu\text{M}$) を加え、同条件下で培養を続けると細胞死が抑制され、68 時間後の観察でも 95 % 以上の細胞が生存していた。

【0056】

試験例 5

【0057】

試験例 3 と同様な方法で培養した未分化 POGC に、過酸化水素 ($100 \mu\text{M}$) を加えると、12 時間後の観察ではすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光学顕微鏡により観察された。この培地に過酸化水素添加前に試験化合物 8 ($3 \mu\text{M}$) を加え、同条件下で培養を続けると、24 時間後の観察でも細胞死が完全に抑制され、95 % 以上の細胞が生存していた。

【0058】

試験例 6

【0059】

試験例 3 と同様な方法で培養した未分化 POGC に、NO 発生試薬として知られる SNP (ニトロプルシドナトリウム, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$, 0.5 mM) を加えると 6 時間後の観察ではすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光学顕微鏡並びに電子顕微鏡により観察され、また MTT 試験によってもその細胞死を確認した。そこで本培養系の培地中に、様々な濃度の試験化合物を加え、48 時間後に細胞を観察した。その結果、アポトーシスを完全に抑制した各化合物の最小有効濃度を表 1 に示す。

【0060】

【表 1】

表 1. ブタ卵巣顆粒膜細胞の SNP 刺激によるアポトーシスの抑制効果

化合物	最小有効濃度 (μM)	化合物	最小有効濃度 (μM)
化合物 1 *	10	化合物 1 2	5

化合物2	15	化合物13	5
化合物3	5	化合物14	3
化合物4	5	化合物15	0.3
化合物5	3	化合物16	1
化合物6	5	化合物17	1
化合物7*	3	化合物18**	3
化合物8	0.7	化合物19**	1
化合物9	0.7	化合物20	10
化合物10	7	化合物21*	3
化合物11	7	化合物22	3

*SNP処理後30時間で判定，**同18時間で判定。

【0061】

比較例1

【0062】

試験例6と同様な方法でサイクリン依存性キナーゼの阻害剤として公知のオロムシン (olomoucine, CALBIOCHEM社より購入) のアポトーシス抑制作用を調べた。その結果、30 μ Mの濃度においても全くアポトーシス抑制作用を示さなかった。

【0063】

試験例7

【0064】

試験例3と同様な方法で培養した未分化POGCに、ビリルビン (30 μ g/mL) を添加すると2日後の観察で50%、3日後の観察で95%の細胞が死ぬ事が光学顕微鏡により観察され、またトリパンブルー排除試験、MTT試験によってもその細胞死を確認した。この培地にビリルビン添加前に試験化合物4 (10 μ M) または試験化合物15 (10 μ M) を加え、同条件で培養を続けると細胞死が抑制され、4日後の観察でもそれぞれ50%、95%の細胞が生存していた。

【0065】

試験例 8

【0066】

マウス顆粒膜細胞にSV40のT抗原とステロイドジェニックファクター-1 (SF-1/Ad4BP) のcDNAを感染させて4 B 2という細胞株を樹立した。この細胞はプロテインキナーゼA依存性にプロゲステロンを分泌する。この4 B 2を10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用い48穴の培養用プレートで細胞がサブコンフルエントになるまで定法に従いCO₂インキュベーターで培養した。培地を2%ウシ胎児血清を含むDMEMに交換し、SNP (0.5 mM) を加えると、16時間後の観察ではすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光学顕微鏡並びに電子顕微鏡により観察された。そこで本培養系の培地中に、SNPを加える前に、試験化合物3、4、7、10、14、または15 (各々10 μ M) を加え、24時間後に細胞を観察した。その結果、いずれの化合物を加えた場合にもアポトーシスが完全に抑制され、95%以上の細胞が生存していた。

【0067】

試験例 9

【0068】

公知の方法 (A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System, 211頁, 1989年, Alan R. Liss, Inc.) に従って7日令ラットの小脳より小脳顆粒細胞を分離、培養した。すなわち上記文献記載の分離操作の後、細胞を10%牛胎児血清を含むDMEM培地 (25 mM KCl, 2 mM glutamineを含む) へ再懸濁し、ポリリジンでコートしたプレートにまき、定法に従い48時間CO₂インキュベーターで培養し、シトシン-1- β -D(+)-アラビノフラノシド (Ara-C) (10 μ M) を添加してさらに培養を継続した。以下の実験には神経突起の伸長が十分完了している培養開始日より14日目以後の細胞を用いた。以上のようにして培養した小脳顆粒細胞に、過酸化水素 (300 μ M) を加えると、16時間後の観察ではすべての細胞が死滅している事が光学顕微鏡により観察された。この培地に過酸化水素添加前に試験化合物8 (10 μ M) または試験化合物9 (10 μ M) もしくは試験化合物10 (10 μ M) を加えた場合には、同じく16時間後の観察でそれぞれ約90%、90%、70%の細胞が生存していた。

【0069】

試験例10

【0070】

新生児核黄疸では体内のビリルビン濃度が異常に高くなることにより、重篤な脳障害をひきおこすことが知られている。これはビリルビンによる神経細胞の障害が原因と考えられるが、実際、試験例9と同様に培養した小脳顆粒細胞にビリルビン ($100 \mu\text{g/mL}$) を添加すると、細胞死をおこすことが光学顕微鏡により観察され、18時間後の観察ではすべての細胞は死滅していた。この際、ビリルビン添加前に試験化合物10 ($10 \mu\text{M}$) を共存させると同じ18時間後の観察で、約80%の細胞が生存していた。

【0071】

試験例11

【0072】

ヒト血液 (2 mL) を遠心分離 (1000 rpm, 5 min) し、赤血球を含む沈殿をDME M培地で3回洗浄後、同培地 (15 mL) に再懸濁 (約 5×10^8 細胞/mL) した。この懸濁液 $10 \mu\text{L}$ をとり10% FCS/DMEM (10 mL) を加え、48穴プレートに分注した ($500 \mu\text{L/well}$)。この赤血球培養液に過酸化水素 ($300 \mu\text{M}$) を加え24時間培養したところ、すべての赤血球が死滅する (へこみのある明るい円形の細胞として観察されていた赤血球が、途中何段階かの形態変化をへて100% 暗いゴーストへと変化する) のが光学顕微鏡で観察された。ここに過酸化水素を加える前に試験化合物4 ($30 \mu\text{M}$)、試験化合物8 ($10 \mu\text{M}$)、試験化合物9 ($20 \mu\text{M}$)、または試験化合物10 ($20 \mu\text{M}$) を加えて同様に24時間後に観察したところ、死んでいる (暗いゴーストへと変化した) 赤血球の割合はそれぞれ20%, 20%, 10%, 10%と過酸化水素単独に比べて大きく減少した。

【0073】

試験例12

【0074】

公知の方法 (機能細胞の分離と培養、丸善、1987年発行、59頁) に従ってマウス線維芽細胞を分離培養した。すなわちマウス皮膚を除毛クリームで除毛後、ヒ

ビテンで消毒し、皮膚組織を小片に切り出した。この皮膚小片が培養用ディッシュの底から浮き上がらない様にスライドガラスを重しとして沈めたまま10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地中で定法に従いCO₂インキュベーターで培養した。線維芽細胞が遊走してきたらスライドガラス及び皮膚片を取り除きさらに培養を続けた。この線維芽細胞にNO発生試薬として知られるSNP (0.5 mM) を加えると12時間後の観察でもすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光学顕微鏡並びに電子顕微鏡により観察された。そこで本培養系の培地中に、SNPを加える前に試験化合物4 (5 μM) または試験化合物8 (2.5 μM) を加え、細胞を観察した。その結果、いずれも48時間後でもアポトーシスが抑制され、95%以上の細胞が生存していた。

【0075】

試験例 13

【0076】

マウスより摘出した腎を無血清DMEM培地中で細かくきざみ、トリプシン/EDTA処理により分散させた。静置後上清を捨て沈殿を培養ディッシュに移し10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地中で定法に従いCO₂インキュベーターで培養した。組織が付着し、細胞のコロニーが形成されたら組織片を取り除き同じ培地で継代した。このようにして得られた単層の腎の細胞（形態的に線維芽細胞には似ていない）にNO発生試薬として知られるSNP (0.5 mM) を加えると12時間後の観察でもすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光学顕微鏡により観察された。そこで本培養系の培地中に、SNPを加える前に試験化合物4 (5 μM) または試験化合物8 (2.5 μM) を加え、細胞を観察した。その結果、いずれも48時間後でもアポトーシスが抑制され、95%以上の細胞が生存していた。

【0077】

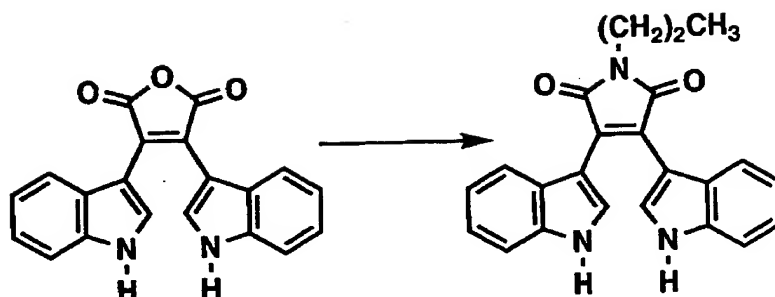
なお、以上の試験例で使用した化合物3、4、7、8、16、17、18、19、21、22に関しては市販品を用い、化合物1、2、12は前記した公知の方法に従って合成した。また化合物5、6、9、10、11、13、14、15、20の合成に関しては以下の参考例に示す。

【0078】

参考例1

【0079】

【化5】



【0080】

公知の方法 (Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年) により合成した化合物1 (46 mg, 0.14 mmol) をDMF (8 mL) と水 (8 mL) に溶かした溶液にn-プロピルアミン (0.06 mL, 0.6 mmol) を加え、100℃ にて1時間攪拌した。減圧濃縮によりDMFを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出し、水洗した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:n-ヘキサン=1:3) によって精製して、化合物5 (45 mg, 87%) を赤色固体として得た。

mp 116-119 °C

^1H NMR (CD_3OD) δ 0.97 (t, $J=7.6$ Hz, 3H), 1.71 (tq, $J=7.6, 7.6$ Hz, 2H), 3.61 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 6.58 (m, 2H), 6.77 (m, 2H), 6.95 (m, 2H), 7.23 (m, 2H), 7.65 (s, 2H).

IR (KBr) 3380, 1680, 1530, 1400, 1240, 740 cm^{-1}

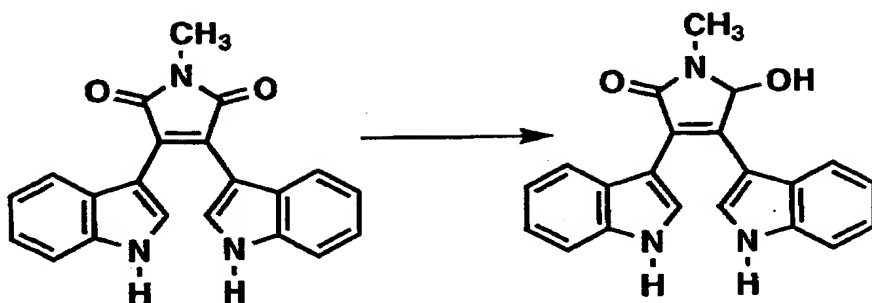
MS m/z 369 (M^+)

【0081】

参考例2

【0082】

【化 6】



【0083】

公知の方法 (Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年) により合成した化合物 4 (163 mg, 0.477 mmol) を THF (10 mL) に溶かした溶液に水素化リチウムアルミニウム (27 mg, 0.72 mmol) を加え、室温にて 29 時間攪拌した。反応液に水 (8 mL) を加え、2N 塩酸水溶液により pH2 とした。減圧濃縮により THF を留去し、濃縮液からジクロロメタン、酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : n-ヘキサン = 1:2 ~ 5:1) によって精製して、化合物 6 (87 mg, 53%) を淡褐色固体として得た。

mp >280°C

^1H NMR (CD_3OD) δ 3.12 (s, 3H), 5.93 (s, 1H), 6.6-6.7 (m, 2H), 6.9-7.4 (m, 8H).

IR (KBr) 3400, 1660, 1540, 1410, 1240, 1090, 1050, 740 cm^{-1}

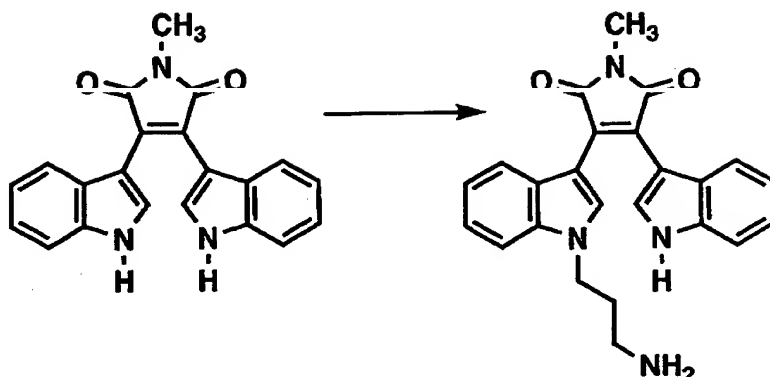
MS m/z 343 (M^+)

【0084】

参考例 3

【0085】

【化7】



【0086】

水素化ナトリウム (60~72%油性, 144 mg) をペンタンで洗浄後DMF (0.8 mL) に懸濁し、そこへ公知の方法 (Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年) に従って合成した化合物4 (409 mg, 1.2 mmol) のDMF溶液 (3 mL) を加え、室温で45分間攪拌した。一方、3-クロロプロピルアミン塩酸塩 (159 mg, 1.2 mmol) とペンタンで洗浄した水素化ナトリウム (60~72%油性, 48 mg) の混合物に0℃でDMF (2.0 mL) を加え5分間攪拌後室温に昇温して静置し、上清を化合物4のナトリウム塩の溶液に加え、さらに残渣をDMF (1 mL) で抽出しその上清を化合物4のナトリウム塩の溶液に加えた。得られた混合物は40℃で1時間攪拌した後、減圧下DMFを留去した。この残渣に塩化メチレンと飽和食塩水を加え、有機層を分取した。水層はさらに塩化メチレンで3回抽出し、得られた有機層を合わせ硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られる残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン: イソプロピルアミン=20:1) によって精製して、化合物9 (296 mg, 55%) を暗赤色固体として得た。

mp 137-140℃

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.81 (tt, $J=6.7, 6.7$ Hz, 2H), 3.05 (s, 3H), 3.1-3.5 (m, 2H), 4.09 (brs, 2H), 4.30 (t, $J=6.7$ Hz, 2H), 6.60 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.67 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.97 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.03 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 11.70 (brs, 1H).

IR (KBr) 3350, 2910, 1750, 1680, 1530, 1430, 1380, 740 cm^{-1}

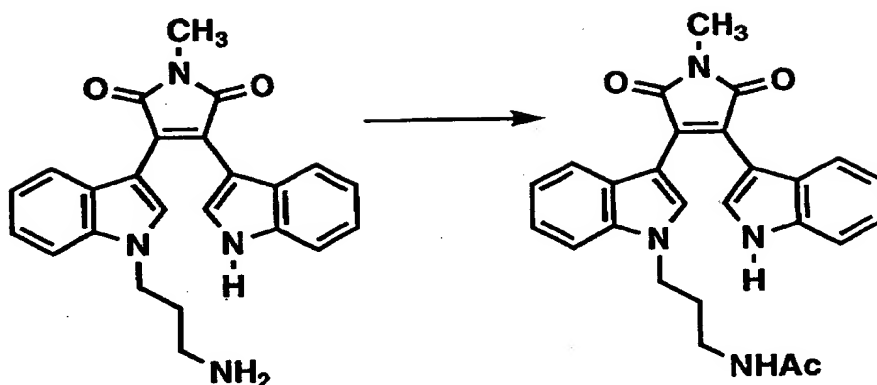
MS m/z 398 (M^+)

【0087】

参考例 4

【0088】

【化 8】



【0089】

化合物 9 (4.0 mg, 0.01 mmol) の塩化メチレン溶液 (300 μL) にトリエチルアミン (7 μL , 0.05 mmol) 及び無水酢酸 (1.1 μL) を加え、室温で 70 分間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加えて塩化メチレンで抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後溶媒を減圧留去して得られる残留物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン: 酢酸エチル = 1:1~1:2) で精製する事により、化合物 10 (3.2 mg, 72%) を暗赤色固体として得た。

mp 86-89 $^{\circ}\text{C}$

^1H NMR (CDCl_3) δ 1.86 (s, 3H), 2.05 (tt, $J=6.7$, 6.7 Hz, 2H), 3.14 (dt, $J=6.7$, 6.7 Hz, 2H), 3.19 (s, 3H), 4.19 (t, $J=6.7$ Hz, 2H), 5.40 (brt, $J=6.7$ Hz, 1H), 6.7-6.8 (m, 2H), 6.99 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.0-7.1 (m, 3H), 7.28 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.77 (d, $J=2.7$ Hz, 1H), 8.68 (brs, 1H).

IR (KBr) 3370, 1690, 1530, 1430, 1380, 740 cm^{-1}

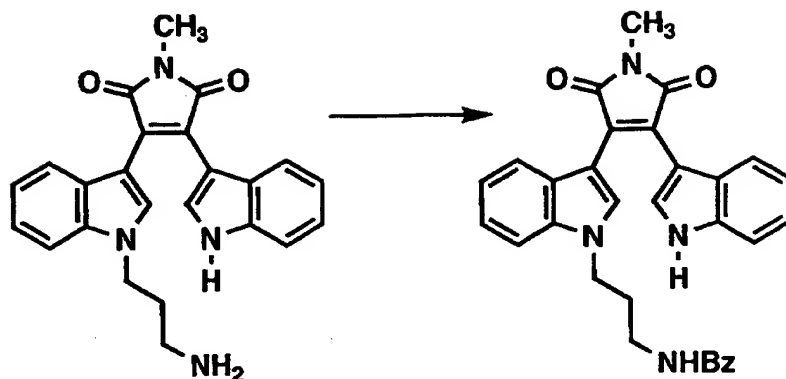
MS m/z 440 (M^+)

【0090】

参考例 5

【0091】

【化 9】



【0092】

化合物 9 (18. mg, 0.045 mmol) の塩化メチレン溶液 (1 mL) にピリジン (18 μ L, 0.23 mmol) 及び塩化ベンゾイル (5.2 μ L, 0.045 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。ピリジン (18 μ L, 0.23 mmol) 及び塩化ベンゾイル (2.0 μ L, 0.017 mmol) を加えさらに室温で 1 時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加えて塩化メチレンで抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後溶媒を減圧留去して得られる残留物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル = 1:1) で精製する事により、化合物 11 (17.0 mg, 75%) を暗赤色固体として得た。

mp 130-133 $^{\circ}$ C

^1H NMR (CDCl_3) δ 2.14 (tt, $J=6.6$, 6.6 Hz, 2H), 3.18 (s, 3H), 3.32 (dt, $J=6.6$, 6.6 Hz, 2H), 4.21 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 6.10 (brt, $J=6.6$ Hz, 1H), 6.7-7.8 (m, 15H), 8.71 (brs, 1H).

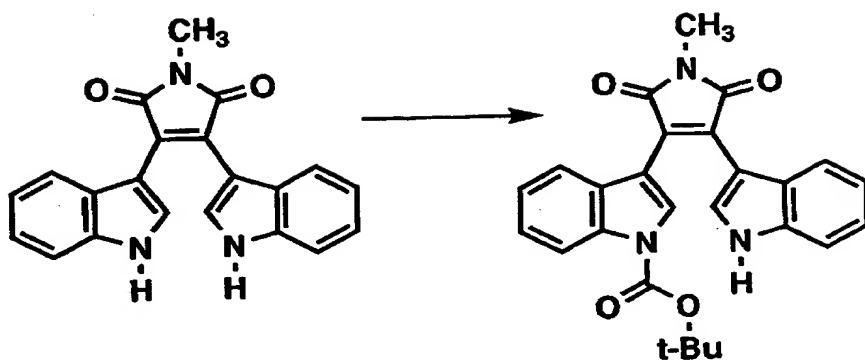
IR (KBr) 3350, 1750, 1680, 1530, 1420, 1380, 730 cm^{-1} MS m/z 502 (M^+)

【0093】

参考例 6

【0094】

【化10】



【0095】

化合物4 (82 mg, 0.24 mmol) をTHF (5 mL) に溶かした溶液に、4℃にてジ-tert-ブチルジカーボネート(52 mg, 0.24 mmol) とジメチルアミノピリジン (1.5 mg, 0.012 mmol) を加え、さらに4℃にて1時間、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル：n-ヘキサン=1:10~1:1) によって精製して、化合物13 (62 mg, 48%) を黄色固体として得た。

mp 110-113℃

^1H NMR (CDCl_3) δ 1.68 (s, 18H), 3.22 (s, 3H), 6.8-7.0 (m, 4H), 7.16 (m, 2H), 8.1-8.2 (m, 2H), 8.13 (s, 2H).

IR (KBr) 2960, 1730, 1550, 1440, 1350, 1240, 1140, 1060, 850, 730 cm^{-1}

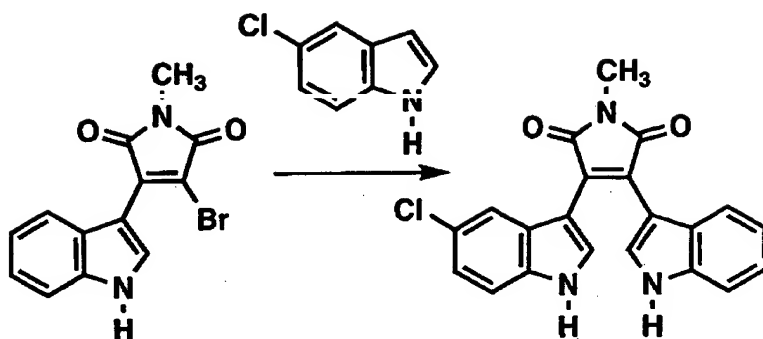
MS m/z 541 (M^+)

【0096】

参考例7

【0097】

【化 11】



【0098】

5-クロロインドール (122 mg, 0.805 mmol) をトルエン (3 mL) に溶かした溶液に、40 °C にて 0.96 M 臭化エチルマグネシウム (0.84 mL, 0.81 mmol) を加え、40 °C にて 45 分間攪拌した。引き続き公知の方法 (Tetrahedron, 44 巻, 2887 頁, 1988 年) に従って合成した 2-ブromo-3-(1H-インドール-3-イル)-N-メチルマレイニミド (70.1 mg, 0.229 mmol) をトルエン (9 mL) に溶かした溶液を加え、加熱還流下 2 時間攪拌した。氷冷下 反応液に 20% ぐえん酸水溶液 (0.5 mL) を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりトルエンを留去し、濃縮液からジクロロメタンで抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : n-ヘキサン = 1:5 ~ 1:1) によって精製し、化合物 14 (89 mg, quant) を淡褐色固体として得た。

mp 114-117 °C

^1H NMR (CDCl_3) δ 3.20 (s, 3H), 6.6-7.4 (m, 7H), 7.76 (m, 1H), 7.86 (m, 1H), 8.50 (brs, 1H), 8.60 (brs, 1H).

IR (KBr) 3350, 1680, 1530, 1440, 1370, 730 cm^{-1}

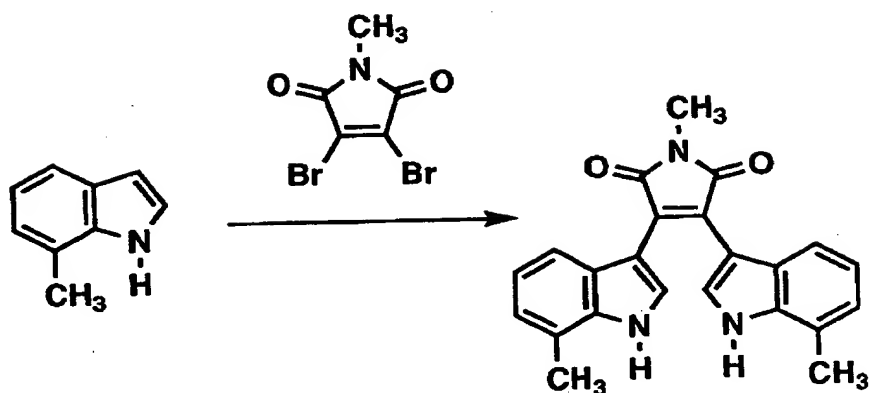
MS m/z 375 (M^+)

【0099】

参考例 8

【0100】

【化 12】



【0101】

7-メチルインドール (162 mg, 1.23 mmol) をトルエン (4 mL) に溶かした溶液に、40 °C にて 0.96 M 臭化エチルマグネシウム (1.28 mL, 1.23 mmol) を加え、40 °C にて 45 分間攪拌した。引き続き 2,3-ジブromo-N-メチルマレインイミド (70.4 mg, 0.276 mmol) をトルエン (9 mL) に溶かした溶液を加え、加熱還流下 2 時間攪拌した。氷冷下反応液に 20% ぐえん酸水溶液 (0.5 mL) を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりトルエンを留去し、濃縮液からジクロロメタンで抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : n-ヘキサン = 1:5 ~ 1:1) によって精製し、化合物 15 (99 mg, 97%) を赤色固体として得た。

mp >300 °C

^1H NMR (CDCl_3) δ 2.48 (s, 6H), 3.21 (s, 3H), 6.6-7.0 (m, 6H), 7.75 (d, $J=3.0$ Hz, 2H), 8.43 (brs, 2H).

IR (KBr) 3320, 1680, 1530, 1420, 1370, 1110, 800, 750, 670, 590 cm^{-1}

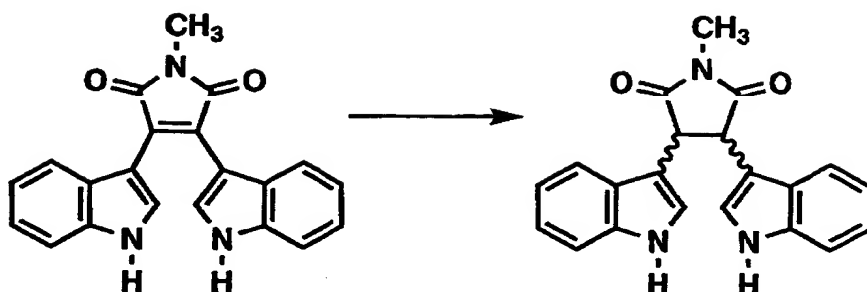
MS m/z 369 (M^+)

【0102】

参考例 9

【0103】

【化 13】



【0104】

公知の方法 (Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年) により合成した化合物 4 (198 mg, 0.580 mmol) を DMF (10 mL) に溶かした溶液に 10% パラジウム炭素 (40 mg) を加え、水素雰囲気下、室温にて一日攪拌した。パラジウム炭素を濾過により除去し、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル: n-ヘキサン=1:10~2:1) によって精製して、化合物 20 (191 mg, 96%) を 2 つの異性体の混合物 (A:B=2.7:1.0) を淡黄色固体として得た。

A: ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.28 (s, 3H), 4.77 (s, 2H), 6.6-7.4 (m, 10H), 7.68 (brs, 2H).

B: ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.26 (s, 3H), 4.41 (s, 2H), 6.6-7.4 (m, 10H), 8.15 (brs, 2H).

MS m/z 343 (M^+)

【0105】

以上の結果から、本発明に係る化合物が様々な刺激によっておこる様々な細胞のアポトーシスによる細胞死を抑制することが判明した。また、初代培養細胞を用い、種々のアポトーシス刺激による細胞死を顕微鏡や染色法などで調べるアッセイ法により、簡便にアポトーシス抑制剤を検出できることが判明した。

【0106】

【発明の効果】

本発明に係るビスインドリルマレイミド誘導体は、広汎なアポトーシス誘発刺激によるアポトーシスを抑制するため、アポトーシスとその発症および増悪に関与しているすべての疾患の予防もしくは治療に有用と考えられる。従って、アル

ツハイマー病、脊髄性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、網膜色素変性症、緑内障、小脳変性、新生児核黄疽などの神経変性疾患、筋ジストロフィー、脳卒中等による脳虚血およびその後の遅発性神経細胞死、心筋梗塞等による虚血性心疾患（心筋虚血と再灌流障害）、ウイルス性心筋炎、自己免疫性心筋炎（拡張型心筋症や慢性心筋炎等）、肥大心および不全心にみられる心筋障害／細胞死、不整脈源性右室心筋症、アルコール性肝炎やウイルス性肝炎、糸球体腎炎や溶血性尿毒症症候群等の腎疾患、後天性免疫不全症候群（AIDS）、中毒性表皮壊死融解（TEN）、多形滲出性紅斑などの炎症性皮膚疾患や脱毛症ならびに移植片宿主反応（GVH）、さらには放射線障害や抗癌剤による副作用、敗血症、再生不良性貧血などの骨髓異形成症、インスリン依存性糖尿病、クロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病、移植臓器等の機能不全の治療薬またはその進行、増悪を停止もしくは抑制する医薬としての用途、並びに細胞、組織、臓器の保存剤としての用途を有する。また、本発明に係る初代培養細胞を用いるアッセイ系は、アポトーシスの抑制剤の探索に有用と考えられる。

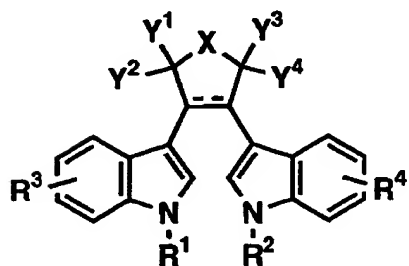
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の目的は、アポトーシスによる細胞死がその進行増悪に関っている種々の疾患の症状の進行の予防および治療薬として期待される、アポトーシスを抑制する有用な薬剤を提供することにある。

【解決手段】 下記一般式 [I]

【化 1】



で表されるビスインドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とするアポトーシス抑制剤、医薬、細胞、組織、臓器の保存剤、初代培養細胞を用いる細胞死抑制物質のアッセイ系。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000173762

【住所又は居所】

神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号

【氏名又は名称】

財団法人相模中央化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】

598023997

【住所又は居所】

埼玉県大宮市土手町1丁目279-1 北大宮住宅
1号棟403号

【氏名又は名称】

朝海 怜

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173762]

1. 変更年月日 1995年 4月14日
[変更理由] 住所変更
住 所 神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号
氏 名 財団法人相模中央化学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[598023997]

1. 変更年月日 1998年 2月23日

[変更理由] 新規登録

住 所 埼玉県大宮市土手町1丁目279-1 北大宮住宅1号棟40
3号

氏 名 朝海 怜